

Zwei vereinfachte biologische Mikromethoden
zur schnellen Bestimmung von Aminoglycosid-Serumspiegeln
bei Neugeborenen

Wolfgang Wildner

1978

Aus der Kinderpoliklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Heinz Spiess

Zwei vereinfachte biologische Mikromethoden zur schnellen
Bestimmung von Aminoglykosid-Serumspiegeln bei Neugeborenen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde an der
Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Wildner
aus
Berlin

1978



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München:

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. J. Suschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Spiess

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 30. März 1978

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	3
2.1. Geschnittene Agarstreifen	3
2.2. Freie Agarzylinder	3
2.3. Massive Agarröhrchen	4
2.4. Seelenröhrchen	4
2.4.1. Große Seelenröhrchen	4
2.4.2. Kleine Seelenröhrchen	5
2.5. Liegeröhrchen	6
2.5.1. Benötigtes Material	7
2.5.2. Herstellung lagerfähiger Liegeröhrchen	7
2.5.3. Herstellung des Standards	8
2.5.4. Ausführung des Tests	8
2.5.5. Ablesung und Auswertung	9
2.6. MERCK Gentamycin-Schnelltest-Set	9
2.6.1. Inhalt	9
2.6.2. Herstellung des Nährbodens	10
2.6.3. Herstellung des Standards	10
2.6.4. Ausführung des Tests	10
2.6.5. Ablesung und Auswertung	11
3. Ergebnisse	12
3.1. Geschnittene Agarstreifen	12
3.2. Freie Agarzylinder	12
3.3. Massive Agarröhrchen	12
3.4. Seelenröhrchen	13
3.4.1. Große Seelenröhrchen	13
3.4.2. Kleine Seelenröhrchen	14
3.5. Liegeröhrchen	14
3.6. MERCK Gentamycin-Schnelltest-Set	16

	Seite
4. Diskussion	17
4.1. Andere Methoden der Antibiotikum-Bestimmung	17
4.1.1. Reihenverdünnung	17
4.1.2. Hämolysetest	18
4.1.3. Säuretest	18
4.1.4. Urease-Test	18
4.1.5. Turbidimetrie	19
4.1.6. Plattenverdünnungstest	19
4.1.7. Radioaktive Markierung	19
4.2. Vergleich der Vor- und Nachteile der beschriebenen Methoden und ihre Anwendungsbereiche	20
4.2.1. Reihenverdünnung	21
4.2.2. Radialer und linearer Agardiffusionstest	22
4.2.2.1. Gemeinsamkeiten	22
4.2.2.2. Unterschiede	24
4.3. Weitere Verbesserungsmöglichkeiten	26
4.3.1. Vergleich möglicher Medien	26
4.3.2. Einfluß des Hämatokrit	27
4.3.3. Industrielle Fertigung	27
4.3.4. Zwei Antibiotika in einem Medium	27
4.4. Dosierung und Toxizität am Beispiel des Gentamycin	28
5. Zusammenfassung	33
Literaturverzeichnis	34
Lebenslauf	38

1. Einleitung

Die Bestimmung von Antibiotikumkonzentrationen in Körperflüssigkeiten ist sowohl für wissenschaftliche Zwecke wichtig (z.B. für den Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Darreichungsformen desselben Medikamentes) als auch für den behandelnden Arzt, der in fraglichen Fällen überprüfen muß, ob er die erforderlichen Konzentrationen erreicht oder überschreitet.

Die zu diesem Zweck häufig angewandte und allgemein bekannte Methode der radialen Agardiffusion, auch Plattendiffusionstest genannt (s.a. 4.2.2.1., S.22f), weist zwei Nachteile auf:

Hemmhofdurchmesser und Konzentration bilden eine logarithmische Beziehung, deshalb nimmt bei einer stufenweisen Verdoppelung der Konzentration der Durchmesser stets um den gleichen Betrag zu und verdoppelt sich nicht etwa auch. Es werden zwar verschiedene Hilfsmittel zur genauen Bestimmung der Durchmesser angeboten, die den Eindruck erwecken, man könne die Hemmhöfe mit einer Genauigkeit von 0,2 mm bestimmen. Tatsächlich verläuft aber bei Einsichtgußplatten von mehr als 1 mm Dicke die Grenze zwischen gehemmtem und nicht gehemmtem Wachstum bei weitem nicht immer so scharf, daß zwei Personen mittels desselben Hilfsmittels immer dasselbe Ergebnis ablesen. Platten mit einer konstanten Dicke von 1 mm sind jedoch schwer produzierbar. Darum kann man leicht auf die Anwendung dieser Geräte verzichten und nur mit Hilfe eines Lineals mit Millimeterskala auf einen halben oder drittel Millimeter Genauigkeit den Durchmesser ablesen.

Durch weitere Fehlerquellen (ovale Hemmhöfe, ungleichmäßige Agarschichtdicke) kann sich eine Ungenauigkeit bis zu etwa 1 mm ergeben. Diese wirkt sich auf Grund der logarithmischen Beziehung in niedrigen Konzentrationsbereichen nur wenig aus, bei hohen Konzentrationen ist dagegen die absolute Fehlerbreite sehr groß.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst versucht, durch Übergang von der radialen zur linearen Diffusion auch die höheren Konzentrationen genauer bestimmbar zu machen. Mit selbstgefertigten Nährböden waren leider keine befriedigenden Ergebnisse zu erzielen.

In weiteren Versuchen gelang es jedoch, das zweite große Problem der radialen Diffusion zu meistern, die schlechte Lagerfähigkeit der vorbereiteten Nährmedien. Herstellung und Handhabung des Testes wurden außerdem soweit vereinfacht, daß er als halbquantitativer Schnelltest auch von bakteriologisch weniger ausgebildetem Laborpersonal durchgeführt werden kann.

2. Material und Methoden

2.1. Geschnittene Agarstreifen

Um das Antibiotikum im wesentlichen in nur eine Richtung diffundieren zu lassen, wurden mit einer Rasierklinge etwa 5 mm breite Streifen aus 3 mm dickem Agar einer Petrischale geschnitten, dessen Oberfläche mit *Staphylococcus aureus* beimpft worden war. Filterpapierblättchen von 4 mm Durchmesser wurden mit je 20 μ l Gentamycinlösung abgestufter Konzentration beschickt und sowohl an je einem Ende der geschnittenen Streifen als auch zum Vergleich auf unzerschnittenen Plattenagar aufgebracht und 18 Stunden bei 37°C bebrütet.

2.2. Freie Agarzylinder

Etwa 7 cm lange Glasröhrchen mit 2 mm Innendurchmesser wurden in flüssigen Agar getaucht, bis sie vollgelaufen waren, dann flach ausgelegt, bis der Agar durch Abkühlen erstarrt war. Mit dünnen Glasstäben (Außendurchmesser etwa 1,5 mm) wurde der erstarrte Agar aus den Röhrchen geschoben und auf eine leere Petrischale fallen gelassen. Diese "Würste" wurden mit einem in Keimsuspension getauchten Wattetupfer bestrichen und anschließend mit Filterpapierblättchen belegt, die abgestufte Gentamycinkonzentrationen enthielten. Die Bebrütung erfolgte in feuchter Kammer 18 Stunden bei 37°C.

2.3. Massive Agarröhrchen

Ähnlich wie im Versuch in 2.2. wurden gleiche Glasröhrchen mit bei 50°C flüssig beimpftem Agar gefüllt. Die Gentamycinlösungen abgestufter Konzentration wurden in konstanten Mengen mit 10 µl-Pipetten am Röhrchenende direkt auf den erstarrten Agar aufgebracht, d.h. ohne Filterpapierblättchen als Träger.

Die Bebrütung erfolgte 24 Stunden bei 37°C, die Hemmzonen wurden über Dunkelfeldbeleuchtung abgelesen.

Mischt man dem noch flüssigen Agar 1 % Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) bei, zeigt sich das Wachstum der Kolonien durch Rotfärbung infolge Ausfällung von unlöslichem Formazan schon an, wenn sie ohne Indikator makroskopisch noch nicht erkennbar wären. Die Bebrütungsdauer verkürzt sich somit auf 10-12 Stunden, die Ablesung kann über Hellfeldbeleuchtung erfolgen.

2.4. Seelenröhrchen⁺)

2.4.1. Große Seelenröhrchen

In 7 cm lange Reagenzgläser mit 8 mm Innendurchmesser wurden etwa 10 cm lange, an ihrem oberen Ende mit Kitt verschlossene Glasröhrchen von 1-1,5 mm Außendurchmesser gestellt; dann wurde bei 60°C flüssig beimpfter Agar in die Reagenzgläser etwa 3 cm hoch eingefüllt und erstarrte dort (Nährboden und

⁺) Agargefüllte Röhrchen mit einer Luftröhre entsprechend der "Seele" eines Gewehrlaufes.

Testkeim aus dem MERCK-Schnelltest, s. 2.6., S. 9). Anschließend wurden die Kittschichten mit einer Nadel durchstochen und die dünnen Glasröhrchen herausgezogen (siehe Schnittzeichnung in Abb. 1 a). Durch Adhäsionskräfte entstand eine

torusartig gewölbte Agaroberfläche, auf die Gentamycinlösung in konstanten Mengen ($50 \mu\text{l}$) aufgebracht wurde.

Nach vierstündiger Bebrütung im Wasserbad von 60°C konnten die Hemmzonen abgelesen werden (s. Abb. 1 b).

Es wurden auch Reagenzgläser mit dickeren und andere mit bis zu vier Seelen hergestellt, um zu untersuchen, ob die vergrößerte Oberfläche ein schnelleres Wachstum der Kolonien bewirkt.

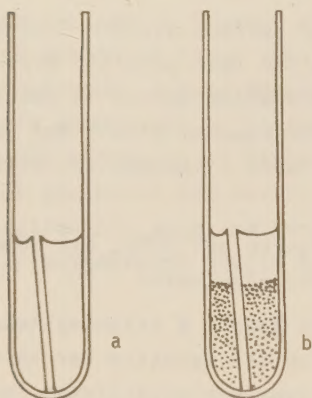


Abb. 1:
Große Seelenröhrchen

2.4.2. Kleine Seelenröhrchen

Ähnlich wie in 2.3. (S. 4) wurden 7 cm lange Glasröhrchen mit 3 mm Innendurchmesser verwendet, in die etwa 10 cm lange Glasröhrchen mit 1,3 mm Außendurchmesser gesteckt wurden. Diese Röhrchenpaare wurden in flüssigen beimpften Agar (MERCK-Schnelltest, s. 2.6., S. 9) gestellt, bis sie vollgelaufen waren und zum Erstarren abgelegt. Nach dem Herausziehen der inneren Röhrchen wurde an jeweils einem Ende die Seele mit einer konstanten Menge flüssigen Agars ($5 \mu\text{l}$ mit Eppendorf-Pipette)

verschlossen. Es entstanden zur Durchführung des Tests vorbereitete Seelenröhrchen entsprechend der vergrößerten Schnittzeichnung in Abb. 2 a.

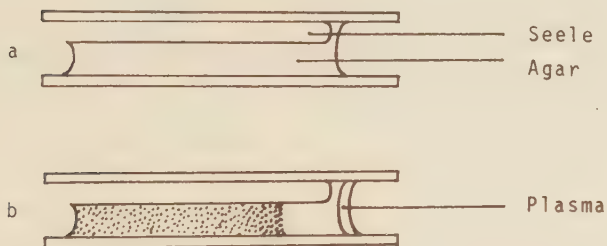


Abb. 2: Kleine Seelenröhrchen

Am jeweils verschlossenen Ende wurden nun konstante Mengen abgestufter Gentamycin-Konzentrationen mit 5 μ l bzw. 10 μ l-Pipetten direkt auf den Agar aufgetragen. Das jeweils offene Ende der Seele wurde nicht mit Testflüssigkeit beschickt, da sonst die Sauerstoffzufuhr unterbrochen würde, damit wüchsen die Kolonien sehr viel langsamer, so daß die Bebrütungszeit wesentlich verlängert werden müßte.

Nach dreistündiger Bebrütung bei 60°C - die Seelenröhrchen liegen in einer im Wasserbad schwimmenden Petrischale mit Deckel - zeigt sich eine Hemmzone entsprechend Abb. 2 b.

2.5. Liegeröhrchen⁺)

Da dieser Test zu den günstigsten Ergebnissen führt (s. 3.5., S.14f), soll seine Vorbereitung und Durchführung genauer beschrieben werden als die vorangegangenen Tests.

⁺) Der Name entstand im laborinternen Sprachgebrauch, weil hier der Agar im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen nicht in stehenden, sondern in liegenden Reagenzgläsern erstarrt.

2.5.1. Benötigtes Material

MERCK Gentamycin-Schnelltest-Set	Eisendraht (Büroklammer)
Wasserbad, regelbar	Pinzette
Pipetten, 3 ml	Klebestreifen (z.B. Tesa-film ^R)
Erlenmeyerkolben, 300 ml	Mikropipetten, 20 und 250 µl
Zentrifugengläser mit Stöpseln, 14x90 mm (Kunststoff)	Filzschreiber, wasserfest
Reagenzglasständer, wasserfest	Körperflüssigkeit, wirkstofffrei
waagerechte, ebene Ablagefläche	
Bunsenbrenner	

2.5.2. Herstellung lagerfähiger Liegeröhrchen

Zubereiten des Nähragars und Beimischen des Testkeims erfolgt nach Schnelltest-Set-Gebrauchsanweisung (s.a. 2.6., S. 9). Dreißig Zentrifugengläser werden ohne Deckel im Reagenzglasständer im Wasserbad bei 60-65°C vorgewärmt und mit je 3 ml beimpften flüssigen Nähragar von 60-65°C gefüllt (Pipette über der Flamme vorwärmen und immer wieder erwärmen, damit an ihrer Innenwand kein Agar erstarrt). Die gefüllten Röhrchen müssen paarweise auf eine waagerechte ebene Fläche zum Abkühlen abgelegt werden (einzeln liegende Röhrchen können leichter wegrollen, das ergibt während der Erstarrungsphase ungleichmäßige Schichten). Die abgekühlten Röhrchen werden mit Stöpseln verschlossen, mit einem über der Flamme glühend gemachten Draht wird je ein Luftloch an das verschlußnahe Ende gegenüber der Agarschicht eingebrannt und mit Klebestreifen wieder verschlossen (s. Abb. 3 a, S. 8). Lagerung im Kühlschrank nach Bedarf bis zu drei Monaten.

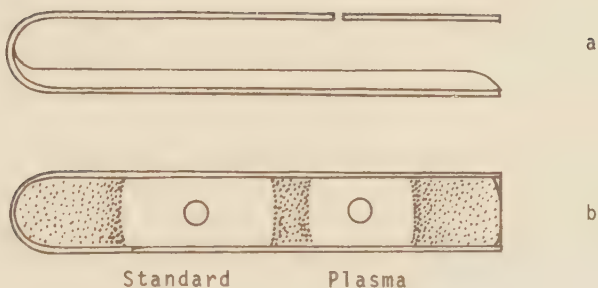


Abb. 3: Liegeröhrchen

2.5.3. Herstellung des Standards

Sie erfolgt nach der Gebrauchsanweisung des Schnelltest-Sets, jedoch sind zwei Konzentrationen ausreichend, z.B. 8 und 2 $\mu\text{g/ml}$ oder 4 und 1 $\mu\text{g/ml}$ (s.a. 2.6., S. 9). Lagerung im Kühlschrank bis zu einer Woche.

2.5.4. Ausführung des Tests

Das Wasserbad wird auf 65°C erwärmt. Pro zu untersuchender Probe entnimmt man dem Kühlschrank je ein Liegeröhrchen, entfernt den Klebestreifen und markiert die Röhrchen mit dem wasserfesten Filzschreiber mit Patienteninitialien o.ä. Je zwei Testblättchen aus dem Schnelltest-Set werden vor die Liegeröhrchen gelegt, davon wird je eines mit 20 μl einer Standardkonzentration beschickt, etwa 5 cm tief in das Liegeröhrchen eingeführt und auf den Agar leicht angedrückt. Das jeweils zweite Testblättchen wird mit dem in 20 μl -Pipetten aufgefangenen Patientenblut beschickt und in etwa 2,5 cm Tiefe auf den Agar angedrückt. Beim Einführen sollen Röhrchenwand und Agar-

oberfläche nicht berührt werden. Die Röhrchen werden mit den Stöpseln verschlossen und mit dem Luftloch nach oben ins Wasserbad gelegt.

2.5.5. Ablesung und Auswertung

Nach etwa drei Stunden Bebrütungszeit ist das Wachstum der Testkeimkolonien so stark, daß die Hemmzonen deutlich abgelesen werden können. Ein Ausmessen mit dem Millimetermaß und Auswerten auf halblogarithmischem Millimeterpapier erübrigt sich im allgemeinen; es genügt, die Proben-Hemmzone mit der Standard-Hemmzone zu vergleichen, um zu erkennen, ob eine gefährliche Antibiotikumkumulation vorliegt oder nicht (s. Abb. 3 b, S. 8).

2.6. MERCK Gentamycin-Schnelltest-Set

Im folgenden soll noch die Original-Testanleitung des Schnelltest-Sets beschrieben werden. Das erscheint notwendig, weil einerseits die Herstellung des Nährbodens und des Standards für die vorstehend beschriebenen Versuche übernommen wurden; andererseits soll in der Diskussion (s. 4.2.2.2., S. 24 f.) ein Vergleich der Originalmethode als Beispiel für die radiale Plattendiffusion mit der von mir vorgestellten linearen Modifikation gezogen werden.

2.6.1. Inhalt

Der Schnelltest-Set enthält zwei Testsätze mit je drei Flaschen:

- I Nährboden: 2,55 g Antibiotica-Medium Nr. 5 Merck, pH 8,0
- II Testkeime: *Bacillus stearothermophilus*-Lyophilisat
- III Standardsubstanz: 16 g Gentamycin-Base (Gentobactin[®] MERCK)
- 1 Beutel mit Testblättchen, 6 mm Ø
- 4 Protokollformulare und eine Testanleitung

2.6.2. Herstellung des Nährbodens

Der Inhalt der Flasche I (Nährboden) wird in 100 ml destilliertem Wasser suspendiert und im Wasserbad bis zur Lösung gekocht. Der Inhalt der Flasche II (Testkeime) wird in 2 ml Wasser suspendiert und dem auf 50-60°C abgekühlten Nährboden unter Umschütteln zugesetzt. Auf einer waagerechten Unterlage werden 12 Petrischalen mit jeweils 8 ml des beimpften Nährbodens beschickt.

2.6.3. Herstellung des Standards

Der Inhalt der Flasche III (Gentamycin-Base) wird je nach der zu untersuchenden Probe in 2,0 ml Serum, Plasma oder anderen Körperflüssigkeiten gelöst und dann in 4 Stufen 1:2 in Serum oder der zu untersuchenden Probe entsprechenden anderen Körperflüssigkeiten weiterverdünnt, so daß Gentamycinkonzentrationen von 8, 4, 2, 1 und 0,5 µg/ml entstehen. Davon werden je 20 µl auf je drei Testblättchen aufgebracht.

2.6.4. Ausführung des Tests

Eine Konzentrationsbestimmung erfolgt auf drei parallel angeordneten Platten. Jede Platte ist beschickt mit einer Standardreihe (5 Blättchen à 20 µl) und der Untersuchungsprobe (3 Blättchen à 20 µl). Nach Auflegen der Blättchen werden die Petrischalen mit aufgesetztem Deckel auf der Wasseroberfläche eines Wasserbades schwimmend bei 60° bis 65°C bebrütet. Eine

Erschütterung, das Öffnen der Platten oder der vorzeitige Versuch, die Platten abzulesen, kann ein Heruntertropfen von Kondenswasser bewirken, das zum Fortschwimmen der Testblättchen führt.

2.6.5. Ablesung und Auswertung

Nach zwei- bis dreistündiger Bebrütung ist das Wachstum des Teststammes so stark, daß sich die Hemmhöfe um die Blättchen deutlich abgrenzen. Die Durchmesser dieser Hemmhöfe werden gegen einen dunklen Untergrund ausgemessen und die erhaltenen Werte in das anliegende Protokoll eingetragen. Zur Auswertung werden die Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser der einzelnen Konzentrationen errechnet und auf halblogarithmischem Papier gegen die Konzentration aufgetragen. Die entsprechende Ausgleichsgerade kann graphisch oder rechnerisch nach DEUTSCHBERGER und KIRSHBAUM (6) ermittelt werden.

3. Ergebnisse

3.1. Geschnittene Agarstreifen

Das Ergebnis dieser ersten Versuche mit der linearen Diffusion war nicht sonderlich befriedigend. Zwar ergaben sich auf den Streifen um 1-2 mm längere Hemmstrecken als auf den Platten, bei jeweils gleichen Konzentrationen; es trat jedoch eine große Streuungsbreite von bis zu 2 mm auf, da es nicht gelang, Streifen zu schneiden, die an allen Stellen gleich breit als auch untereinander gleich waren. Außerdem können die Streifen beim Umlagern unkontrolliert gestaucht oder in die Länge gezogen werden.

3.2. Freie Agarzylinder

Auch nach dem Verlängern der Bebrütungszeit auf 24 Stunden zeigte sich kein makroskopisch sichtbares Wachstum und damit keine Hemmzonen. Offensichtlich ziehen Kapillarkräfte die Antibiotikumlösung in den Spalt zwischen Auflagefläche und Agarzylinder, so daß die Diffusion nicht nur vom aufgelegten Filterpapierblättchen, sondern auch von beiden Seiten ausgeht. Dadurch wird verhindert, daß die Kolonien ihre kritische Größe erreichen.

3.3. Massive Agarröhrchen

Da der Testkeim hier anaerob wachsen muß, ist eine lange Bebrütungszeit von mindestens 20 Stunden nötig, bei Verwen-

derung des Indikators TTC mindestens 10 Stunden. Die Konstanz der Agarschichtdicken führt jedoch zu sehr guter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, eine Streubreite ist praktisch nicht vorhanden.

Gegenüber den beiden vorangegangenen Versuchsreihen führt dieser Test erstmals zu guten, reproduzierbaren Ergebnissen (Meßwerte analog 3.4.). Wegen der erforderlichen Länge der Bebrütungsdauer wurde er in dieser Form nicht weiter fortgeführt.

3.4. Seelenröhrchen

3.4.1. Große Seelenröhrchen

Die in die Tiefe des Agars hineinreichende Luftröhre führt so viel Sauerstoff zu, daß der Testkeim aerob wachsen kann. Daher erreichen die Kolonien schon nach etwa vierstündiger Bebrütung eine Größe, die Hemmzonen zweifelsfrei erkennen lassen. Dabei ist der Durchmesser und die Anzahl der Seelen unerheblich, Röhrchen mit dicken oder mehreren Seelen benötigen dieselbe Bebrütungszeit wie solche mit nur einer dünnen Seele.

Wie in Abb. 1 b (S. 5) angedeutet, ergibt sich keine Kongruenz der beiden die Hemmstrecke begrenzenden Flächen. Die Agaroberfläche, von der aus die Diffusion startet, ist toroid, die Wachstumsgrenze ist annähernd sphärisch. Diese Diskrepanz läßt keine genaue Längenbestimmung der Hemmstrecke zu. Daher wurde diese Methode zugunsten der kleinen Seelenröhrchen aufgegeben.

3.4.2. Kleine Seelenröhrchen

Entsprechend der Abb. 2 b (S. 6) stimmen hier die beiden die Hemmzone begrenzenden Flächen in ihrer Form überein, eine Längenbestimmung entlang der gedachten Längsachse des Röhrchens ist eindeutig möglich. Die erforderliche Bebrütungsdauer beträgt etwa 3-4 Stunden.

Die Reproduzierbarkeit der Hemmzonen war gut, siehe Tabelle 1. Bei einer Fünffachbestimmung jeder Konzentration trat eine Streubreite von etwa 0,3 mm auf, das entspricht einer Fehlerbreite von etwa 30 %.

Genta-Konzentration	Hemmzonen [mm]				
8 µg/ml	11	10,7	11	11	11
4 µg/ml	10	10	10	10,3	10
2 µg/ml	9,3	9	9	9,3	9,3
1 µg/ml	8	8,3	8	8	8

Tab. 1: Hemmzonen bei kleinen Seelenröhrchen

Die Grenze zwischen Agar und angrenzendem Serum (s. Abb. 2 b, S. 6) kann bei Übereinstimmung der Farben schwierig zu erkennen sein. Statt des Serum darf kein Vollblut aufgetragen werden, da der aus den Erythrozyten austretende Blutfarbstoff in den Agar eindiffundiert und die Grenze zwischen Agar und Blut unkenntlich macht.

3.5. Liegeröhrchen

Das Luftloch in den Liegeröhrchen läßt genügend Sauerstoff zutreten, so daß der Testkeim aerob wachsen kann. Daher genügt

eine Bebrütungsdauer von 3-4 Stunden. Die Hemmzonen lassen sich entlang der gedachten Längsachse zweifelsfrei bestimmen (s. Abb. 3 b, S. 8).

Die Reproduzierbarkeit der Hemmzonen ist gut; bei einer Zehnfachbestimmung von zwei Gentamycinkonzentrationen trat eine Streubreite von 0,5 mm auf, das entspricht einer Fehlerbreite von etwa 25 % (s. Tab. 2).

Konzentration	Hemmstrecken [mm]									
8 $\mu\text{g/ml}$	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
2 $\mu\text{g/ml}$	14	14	14,5	14,5	14,5	14,5	14,5	14,5	14,5	14,5

Tab. 2: Hemmstrecken bei Liegeröhrchen

Die Hemmstrecken lassen sich auch dann gut ablesen, wenn Serum und Agar gleiche Farbe aufweisen oder wenn Vollblut verwendet wird, weil im Gegensatz zum Seelenröhrchentest hier die Agar-Serum-Grenze bzw. Agar-Vollblut-Grenze kein Meßpunkt ist (s.a. Abb. 3 b, S.8).

Werden die Liegeröhrchen im Reagenzglasständer im Wasserbad stehend bebrütet, dann rutscht in der überwiegenden An-



zahl der Fälle die Agarschicht unterschiedlich weit nach unten und wird dabei unkontrollierbar gestaucht und verzerrt, s. Abb. 4. Dabei kann auch die Hemmstrecke ihre Länge verändern und zu falschen Ergebnissen führen. Daher ist es wichtig, daß die Liegeröhrchen liegend bebrütet werden.

Abb. 4: Stehend bebrütetes Liegeröhrchen

Schwimmen die Röhrchen beim Bebrüten nicht im Wasserbad, sondern werden z.B. im Warmluftschrank inkubiert, dann wird

die optimale Wachstumsgeschwindigkeit des Testkeims nicht so schnell erreicht, und die erforderliche Bebrütungszeit verlängert sich um bis zu einer halben Stunde.

Dank der gut schließenden Stöpsel waren die Liegeröhrchen noch nach 15 Wochen Lagerung im Kühlschrank verwendbar. Nur 2 von 70 Röhrchen zeigten nach dieser Zeit Pilzbewuchs, der im Test den Keim hemmt und zu einer Verschiebung der Hemmhofgrenzen führen kann.

Strebt man eine derartig lange Lagerfähigkeit an und steht am Ort der Durchführung des Tests eine Bunsenflamme zur Verfügung, empfiehlt es sich, die Luftlöcher erst kurz vor Gebrauch der Röhrchen einzustechen. Undichtigkeiten an der Klebstelle der Löcher setzen nämlich die Lagerfähigkeit herab.

3.6. MERCK Gentamycin-Schnelltest-Set

Damit die lineare Agardiffusion mit der radialen verglichen werden kann, wurde in Anlehnung an die Originalmethode eine Zehnfachbestimmung von zwei Gentamycinkonzentrationen auf fünf Agarplatten durchgeführt, s. Tab. 3. Die Reproduzierbarkeit ist ebenso gut, die Streubreite betrug 0,5 mm, was hier einer Fehlerbreite von über 25 % entspricht.

Konzentration	Hemmstrecken [mm]									
	Platte 1		Platte 2		Platte 3		Platte 4		Platte 5	
8 µg/ml	20	20	20	20	19,5	19,5	20	20	20	20
2 µg/ml	17	17	17	17	16,5	17	17	17	17	17

Tab. 3: Hemmstrecken beim Plattentest

4. Diskussion

4.1. Andere Methoden der Antibiotikum-Bestimmung

4.1.1. Reihenverdünnung

Dieses wohl älteste Verfahren zur quantitativen Bestimmung eines Antibiotikums erfordert zwei getrennt verlaufende Untersuchungen. Im Vorversuch wird die Minimale Hemm-Konzentration (MHK) eines geeigneten Testkeims bestimmt, d.h. die geringste Antibiotikum-Konzentration, die gerade noch in der Lage ist, das sichtbare Wachstum des Keims zu verhindern. Im Hauptversuch wird bestimmt, in welcher Verdünnung die auf ihren Antibiotikumgehalt zu untersuchende Flüssigkeit (z.B. Plasma) das Wachstum des Testkeims gerade noch hemmt. Dann kann durch Multiplikation der im Vorversuch bestimmten MHK mit dem im Hauptversuch bestimmten Verdünnungsfaktor die tatsächliche Konzentration der Probe errechnet werden.

Für die Bestimmung der MHK werden Nährlösungen, die dem Testkeim gutes Wachstum ermöglichen, mit genau bekannten abgestuften Wirkstoffmengen versetzt, mit dem Testkeim beimpft und so lange bebrütet, bis an einem wirkstofffreien Kontrollgefäß das Wachstum durch Trübung oder Niederschlag erkennbar ist. Im Hauptversuch wird entsprechend verfahren: Von der Probe wird eine Reihe abgestufter Verdünnungen hergestellt, mit Nährlösung versetzt, mit dem Testkeim beimpft und auch so lange bebrütet, bis im Kontrollgefäß Wachstum erkennbar ist. Dann erfolgt die Ablesung: Die geringste Konzentration der Verdünnungsreihe, die das Auftreten einer Trübung verhindert, gilt als die MHK.

Ein einziger Vorversuch kann zur Grundlage mehrerer Hauptversuche dienen, wenn überall dieselben Nährlösungen, Körperflüssigkeiten, Verdünnungsflüssigkeiten und Testkeime verwen-

det werden. Der Vorversuch sollte jedoch einmal täglich zu den Hauptversuchen durchgeführt werden, damit man sichergeht, daß der Testkeim nicht durch Fremdkeime verunreinigt ist oder im Laufe der Zeit seine Empfindlichkeit verliert (resistent wird). Damit ergäben sich falsch niedrige Ergebnisse (nach HALLMANN (12, S. 585)).

4.1.2. Hämolysetest

Ist der Testkeim zur Hämolysen fähig, so können dem Reihenverdünnungstest vor dem Bebrüten Erythrozyten als Wachstumsindikator zugesetzt werden. Nach KLEIN (19, S. 69) genügt ein Zusatz von "1 ml Vollblut (Mensch oder Kaninchen) auf 200 ml Bouillon, um im Reagenzglas eine deutlich wahrnehmbare Trübung zu erzielen; diese hellt sich bei der Bildung von Hämolyse voll auf".

4.1.3. Säuretest

Ist der Testkeim zur Glykolyse fähig und enthält die Bouillon Glukose (0,5-1 %), kann das Wachstum des Testkeims nach der Inkubation durch Zugabe eines Säure-Indikators deutlich gemacht werden.

4.1.4. Urease-Test

Hier enthält die Nährbouillon Harnstoff, als Testkeim dient *Proteus mirabilis*. Er bildet Urease, die Harnstoff zu Ammoniak und Kohlendioxid hydrolysiert; dadurch steigt der pH-Wert des

Mediums schnell an. Steigende Konzentrationen von Gentamycin (oder anderer Aminoglycosidantibiotika) verlangsamen zunehmend diesen pH-Anstieg. Man bebrütet 2 Stunden und mißt dann die pH-Werte. Diese werden in einer Graphik gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen und der pH der Probe in die Eichkurve interpoliert (nach NOONE (26, S. 16 f.)).

4.1.5. Turbidimetrie

Diese Modifikation der Reihenverdünnung arbeitet im sub-inhibitorischen Bereich. Photometrisch wird die Trübung durch das Bakterienwachstum gemessen, ehe es makroskopisch sichtbar ist. Die Extinktion eines Probenröhrchens mit partieller Hemmung wird in die Eichkurve interpoliert.

4.1.6. Plattenverdünnungstest

Hier wird die Nährbouillon durch Agarzusatz verfestigt und statt in Glasröhrchen in Petrischalen (Platten) verarbeitet, ansonsten entspricht der Test dem üblichen Reihenverdünnungstest (nach HALLMANN (12, S. 587)).

4.1.7. Radioaktive Markierung

Diese Methode arbeitet nicht biologisch, sondern physikalisch-chemisch. Man verwendet ein spezielles Enzym, das Gentamycin, Kanamycin und Tobramycin adenyliert. Adenosintriphosphat (ATP) dient als Adenylgruppenspender und ist mit ^{14}C radioaktiv

markiert. Adenyliertes Gentamycin trägt eine positive elektrische Ladung und verbindet sich mit negativ geladenem Phosphocellulose(PC)-Papier; unverbrauchtes ATP ist elektrisch neutral und geht mit dem PC-Papier keine chemische Bindung ein, es kann von ihm abgewaschen werden.

Stellt man also eine Lösung aus radioaktiv markiertem ATP, Enzym und Gentamycinstandard bzw. gentamycinhaltiger Probe her, pipettiert diese Lösung auf ein Stück PC-Papier und wäscht das überschüssige ATP ab, ist die meßbare Radioaktivität des PC-Papiers dem Gentamycingehalt direkt proportional. Der Test wird durch anwesende andere Antibiotika wie Penicillin, Ampicillin, Cephalotin oder Polymyxin nicht beeinflusst, da das Enzym nur die drei oben genannten Antibiotika adenyliert (nach SMITH (36, S. 583 f.)).

Andere Verfahren arbeiten statt mit radioaktiv markiertem ATP mit markierten Antikörpern (Radioimmuntest).

4.2. Vergleich der Vor- und Nachteile der beschriebenen Methoden und ihre Anwendungsbereiche

Im folgenden soll nur auf die Reihenverdünnung sowie auf radiale und lineare Agardiffusion näher eingegangen werden: Säure-, Hämolysetest und Plattenverdünnung sind Varianten der Reihenverdünnung, die keine echten Vorteile bringen; Urease-Test, Turbidimetrie und radioaktive Markierung sind zwar sehr schnelle Verfahren, erfordern aber einen erhöhten apparativen Aufwand und entsprechend speziell geschultes Personal, alle diese Methoden sind daher für die routinemäßige Durchführung auch im kleineren Labor nicht geeignet. Bei den radioaktiven Tests sind außerdem die Strahlenschutzbestimmungen einzuhalten.

4.2.1. Reihenverdünnung

Die Einhaltung steriler Arbeitsbedingungen ist die wichtigste Voraussetzung für korrekte Ergebnisse. Kontamination durch Fremdkeime mit größerer MHK als der des Testkeims führt im Hauptversuch zu einem scheinbar geringeren Verdünnungsfaktor, und nach der Formel

$$\text{Verdünnungsfaktor} \times \text{MHK} = \text{Konzentration der Probe}$$
errechnet sich ein falsch niedriges Ergebnis. Umgekehrt täuscht Kontamination im Vorversuch eine höhere MHK vor, was zu falsch hohen Ergebnissen führt.

Strikt steriles Arbeiten erfordert hohen Arbeits- und Zeitaufwand.

Falsche Ergebnisse können auch durch Pipettierungsfehler beim schrittweisen Verdünnen der Verdünnungsreihe auftreten. Der Pipette außen anhaftende Flüssigkeit erhöht die tatsächliche Übertragungsmenge, so daß z.B. die tatsächliche Konzentration im 8. Röhrchen der Reihe bei einem Übertragungsfehler von nur 5 % um etwa 40 % höher ist als errechnet.

Eine weitere Fehlerquelle liegt in der Art der Auswertung. Üblicherweise geht man davon aus, daß die geringste Konzentration der Testreihe, die zur Wachstumshemmung führte, die MHK sei. Tatsächlich aber können noch geringfügig niedrigere Konzentrationen den Keim hemmen, wenn sie nur größer sind als die Konzentration im ersten bewachsenen Röhrchen. Um diesen Bereich der Ungenauigkeit möglichst gering zu halten, sind Mehrfachbestimmungen mit verschiedenen abgestuften Verdünnungsreihen erforderlich.

Da schon ein geringfügiger Fehler (z.B. Pipettierfehler) die Grenze zwischen Wachstum und Hemmung um 1 Röhrchen verschieben kann, ist die Methode der Reihenverdünnung im Nor-

malfall mit einer Fehlerbreite von +100-50 % behaftet, die Sicherheit des Ergebnisses kann aber durch einen hohen Arbeitsaufwand erhöht werden.

Kritische Beurteilung: Die digitale Methode der Reihenverdünnung erfordert durchgehend strikte Wahrung der Sterilität und bedingt schon dadurch einen hohen Arbeitsaufwand, der sich mit zunehmender Anforderung an die Genauigkeit des Ergebnisses noch erhöht. Daher ist diese Methode für den routinemäßigen klinischen Gebrauch nur schlecht geeignet. Die Reihenverdünnung eignet sich dagegen gut für wissenschaftliche Zwecke, da sich die Genauigkeit der Ergebnisse mit entsprechendem Arbeitsaufwand nahezu beliebig erhöhen läßt.

4.2.2. Radialer und linearer Agardiffusionstest

4.2.2.1. Gemeinsamkeiten

Das Funktionsprinzip der Agardiffusionstests sei hier kurz aufgezeigt, weil sich aus ihm vier wichtige Vorteile gegenüber der Reihenverdünnung erklären lassen.

Eine antibiotikumhaltige Probe wird auf ein geeignetes festes, gleichmäßig beimpftes Substrat (Nähragar) aufgebracht und bebrütet.

Das Antibiotikum diffundiert in einer von seiner Konzentration abhängigen Geschwindigkeit in das angrenzende Substrat, wobei sich ein der zurückgelegten Entfernung entsprechendes Konzentrationsgefälle einstellt.

Während der Bebrütung wachsen alle von der aufgetragenen Probe genügend weit entfernten Keime bald zu Kolonien einer sogenannten kritischen Größe an, nach deren Erreichen ein Ansteigen der Wirkstoffkonzentration über die MHK hinaus durch

weitere Diffusion keine Wachstumshemmung mehr bewirkt. Nur diejenigen Keime werden am Weiterwachsen gehindert, die so nahe an der Probe sind, daß durch die Diffusion des Antibiotikums die MHK erreicht wird, ehe die Kolonien zu ihrer kritischen Größe angewachsen sind. Da die kritische Größe der Kolonien im makroskopisch nicht sichtbaren Bereich liegt, entsteht nach dem Bebrüten rings um die aufgetragene Probe eine kreisförmige Fläche ohne sichtbares Wachstum, die sogenannte Hemmzone, auch Hemmhof genannt. Ihr Durchmesser ist von der Bebrütungsdauer unabhängig. Je höher die Antibiotikumkonzentration der Probe ist, desto größer ist der Hemmhof.

Um quantitativ von der Hemmhofgröße (Durchmesser) auf den Antibiotikumgehalt schließen zu können, werden die Hemmhöfe einer Standardreihe bestimmt und auf semilogarithmischem Millimeterpapier in eine Graphik eingetragen, die Konzentration auf der logarithmischen Abszisse, die Hemmhofdurchmesser auf der numerischen Ordinate. Der Hemmhofdurchmesser der Probe wird dann in die Eichkurve interpoliert. Je steiler die Eichkurve ist, desto weniger wirkt sich eine Ablesungenauigkeit beim Ausmessen des Hemmhofdurchmessers der Probe im Endergebnis aus.

Aus dem Funktionsprinzip lassen sich vier Vorteile gegenüber der Reihenverdünnung ableiten:

1. Eine geringfügige Kontamination der Testplatten der Proben oder der Arbeitsgeräte ist unerheblich, weil die Kolonien der Fremddeime auf Grund ihres anderen Aussehens und vereinzelten Auftretens sich von den Testkeimkolonien unterscheiden und für die Auswertung außer acht gelassen werden können.
2. Die Bebrütungsdauer kann nach Bedarf verlängert werden, ohne daß sich die Hemmhofdurchmesser und damit die Ergebnisse verändern. Im Gegensatz hierzu verschiebt sich bei

der Reihenverdünnung durch längere Inkubation die Grenze zwischen bewachsenen und unbewachsenen Röhrchen; dadurch wird das Ergebnis verfälscht.

3. Die Agardiffusion ist eine analoge Meßmethode. Besonders die niedrigen Konzentrationen können mit nahezu beliebiger Genauigkeit, die nur durch die Ablesegenauigkeit eingeschränkt wird, ohne Vielfachbestimmung ermittelt werden. Die digitale Methode der Reihenverdünnung zeigt dagegen das Ergebnis nur in Intervallen und erfordert zur genaueren Einengung der Intervalle Mehrfachbestimmungen mit unterschiedlichen Konzentrationsabstufungen.
4. Als Testflüssigkeit läßt sich auch Vollblut verwenden, da die korpuskulären Anteile sowie der größte Teil des Blutfarbstoffs nicht in das Nährsubstrat eindiffundieren.

4.2.2.2. Unterschiede

Wenn auch die Streubreite der Hemmstrecken bzw. Hemmhöfe bei sorgfältiger Vorbereitung und Durchführung bei Liegeröhrchen und Plattentest praktisch gleich groß ausfällt, sind doch auf Grund theoretischer Überlegungen bei der radialen Agardiffusion mehr Fehlerquellen möglich, und damit ist die Wahrscheinlichkeit, bei nur mittelmäßiger Sorgfalt dennoch gute Ergebnisse zu erzielen, bei der linearen Agardiffusion größer.

Die entscheidende Fehlermöglichkeit liegt beim Diffusionstest in der Ungleichmäßigkeit der gegossenen Agarschichten. Ungleiche Schichtdicken ergeben bei gleichen Konzentrationen ungleiche Hemmzonen und täuschen damit ungleiche Konzentrationen vor.

Im Plattentest muß die Agarschicht an allen Stellen der Petrischale gleich dick sein, auch sollten alle Petrischalen untereinander gleiche Schichtdicken aufweisen. Dazu müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein: ebener Boden der Petrischale (müßte geschliffen sein), beim Gießen genau waagerechte Unterlage, ebene Oberfläche der Gußschicht (Temperaturabhängigkeit von Ko- und Adhäsion!), konstante Ausmaße der Petrischalen und konstante eingefüllte Agarmengen.

Demgegenüber kann die Methode der kleinen Seelenröhrchen geradezu nachlässig durchgeführt werden: Das Gleichmaß der entstehenden Agarschicht ist nur vom Gleichmaß der verwendeten Röhrchen und Stäbe abhängig. Das äußert sich auch in der geringeren Streubreite.

Bei der Herstellung der Liegeröhrchen ist das Gleichmaß der Schichtdicken praktisch nur von der Konstanz der eingefüllten Agarmengen und der Konstanz der Röhrchenausmaße abhängig. Die beim Gießen verwendete Unterlage muß nicht genau waagerecht und eben sein, eine Wölbung oder leichte Neigung ist unerheblich, wenn die Liegeröhrchen mit ihrer Längsachse senkrecht zur Falllinie liegen.

Der größte Vorteil der Liegeröhrchen besteht in ihrer guten Lagerfähigkeit. Während sich Agarplatten nur etwa eine Woche halten, können die Liegeröhrchen über drei Monate im Kühlschrank gelagert werden. Der Grund ist darin zu finden, daß die Petrischalen nicht luftdicht verschlossen werden können.

In den kleinen Seelenröhrchen lassen sich gleichmäßige Agarschichten am sichersten und problemlosesten herstellen; der Nachteil dieser Methode besteht darin, daß sich die Röhrchen mangels passender Stöpsel noch nicht lagern lassen. Außerdem können nur klare Flüssigkeiten und kein Vollblut untersucht werden.

Kritische Beurteilung: Die analoge Methode der Agardiffusion stellt nicht so hohe Ansprüche an sterile Arbeitsbedingungen wie die Reihenverdünnung. Der Arbeitsaufwand ist bei der Agardiffusion geringer als bei der Reihenverdünnung. Der Plattentest (radiale Diffusion) bietet mehr Fehlermöglichkeiten als Liegeröhrchen und kleine Seelenröhrchen (lineare Diffusion). Die Liegeröhrchen können sehr lange gelagert werden und erfordern zu ihrer Herstellung vergleichsweise wenig Sorgfalt. Somit erscheint diese Methode für den routinemäßigen klinischen Gebrauch als am besten geeignet.

4.3. Weitere Verbesserungsmöglichkeiten

Im folgenden sollen noch kurz einige Ansatzpunkte aufgezeigt werden, auf welchen Gebieten noch Arbeitserleichterungen oder Ausweitung der Anwendungsmöglichkeiten denkbar sind.

4.3.1. Vergleich möglicher Medien

Soll als zu untersuchende Probe nicht Vollblut verwendet werden, sondern Plasma oder Serum, wäre es eine Vereinfachung bei der Herstellung des Standards, diesen statt aus Plasma bzw. Serum aus physiologischer Kochsalzlösung herzustellen. Dazu müßte untersucht werden, in welchem Ausmaß Hemmhofunterschiede bei Kochsalz, Plasma und Serum auftreten. KLEIN (19, S. 101) weist hier auf die je nach gewähltem Antibiotikum unterschiedliche Serumeiweißbindung hin.

4.3.2. Einfluß des Hämatokrit

Wird der Test mit Vollblut durchgeführt, so wäre es wünschenswert, eine einfache Umrechnung zu finden, die es ermöglicht, die Hemmstrecken eines Standards mit normalem Hk einerseits mit einer Blutprobe mit stark abweichendem Hk andererseits zu vergleichen.

4.3.3. Industrielle Fertigung

Der Liegeröhrchentest könnte noch genauer werden, wenn die Herstellung der Agarschicht nicht durch Pipettierung von Hand geschähe, sondern durch einen Automaten. Bei industrieller Herstellung könnte zudem noch eine zumindest stichprobenartige Überprüfung der Schichtdicke stattfinden, die optisch (photometrisch) oder elektrisch (Widerstandsmessung) durchgeführt werden könnte.

Die Seelenröhrchenmethode würde noch brauchbarer, wenn industriell gefertigte 3 mm-Kunststoff-Röhrchen geeigneter Länge mit dazu passenden dichten Verschlüssen im Handel wären.

Eine weitere Arbeitserleichterung ergibt sich durch käufliche fertig vorbereitete Gentamycin-Standard-Papierblättchen; ERICSSON (9, S. 108) gibt ihre Haltbarkeit mit mindestens einem halben Jahr an.

4.3.4. Zwei Antibiotika in einem Medium

Häufig wird Gentamycin nicht allein verabreicht, sondern zusammen mit einem zweiten Antibiotikum, etwa mit Penicillinarten wie Ampicillin oder Carbenicillin (NELSON (24, S. 801)).

Die Hemmzonen derartiger Seren lassen nicht erkennen, welcher Anteil der Hemmwirkung auf jedes der beiden Antibiotika entfällt. Will man die Konzentration des einen Wirkstoffes bestimmen, so muß der andere unwirksam gemacht werden. Das kann nach KLEIN (19, S. 113 f.) auf drei verschiedene Arten erreicht werden:

1. Die Wirkung des einen Hemmstoffes wird durch Antagonisten annulliert, z.B. Sulfonamid durch p-Aminobenzoessäure oder Tetracyclin durch Kalziumionen.
2. Der unerwünschte Hemmstoff wird zerstört, etwa Penicillin durch Penicillinase oder Tetracyclin durch Wärme (48 Std. bei 37°C oder 3 Std. bei 56°C und pH 7,8). JUSTESSEN (18, S. 111) verwendet penicillinase-getränkte Filterpapierblättchen. Das soll auch die Inaktivierung beträchtlicher Mengen relativ penicillinase-stabiler Antibiotika ermöglichen, die zusammen mit Aminoglycosiden in den Proben sind. SABATH (32, S. 458) verwendet eine "Breitband"- β -Lactamase, die alle Penicilline und Cephalosporine außer Cephalixin inaktiviert und die Bestimmung von Vancomycin und allen Aminoglycosiden erlaubt. Die β -Lactamase wird dabei dem Serum zugesetzt, dieses wird nach fünf Minuten auf die Filterpapierblättchen aufgebracht.

An der Kinderpoliklinik der Universität München ist zur Zeit eine Modifikation in Erprobung, bei der das Serum auf mit β -Lactamase beschickte und lyophilisierte Papierblättchen aufgetragen wird.

3. Man verwendet als Testkeim eine Mutante, die gegenüber dem einen Antibiotikum eine hohe Sensibilität zeigt, gegen das andere jedoch resistent ist.

4.4. Dosierung und Toxizität am Beispiel des Gentamycin

Während Penicillin nur bei extrem hoher Dosierung als giftig gilt, treten bei den neueren Antibiotika toxische Neben-

wirkungen auf, besonders bei den Aminoglycosid-Antibiotika. Zu diesen zählen im wesentlichen Streptomycin, Neomycin, Kanamycin und Gentamycin. Streptomycin soll wegen der Resistenz der meisten Bakterienstämme nur noch gegen Tuberkulose verwendet werden (KUSCHINSKY (21, S. 225)), Neomycin eignet sich hauptsächlich zur lokalen Applikation, Kanamycin ist "bei Niereninsuffizienz, Neugeborenen und in der Gravidität ... kontraindiziert" (HELWIG (13, S. 125)). Somit verbleibt nur das Gentamycin zu einer Anwendung gegen sogenannte Problemkeime.

Bei Gentamycin werden Vestibularisschäden und Innenohrschwerhörigkeit, ferner Kernikterus bei Früh- und Neugeborenen, gelegentlich Exantheme, reversible Proteinurie und Rest-N-Anstieg, selten SGOT-Anstiege beschrieben (nach HELWIG (13, S. 114 f.)). Über die Nierenschädigung durch Gentamycin gehen die Ansichten in der Literatur etwas auseinander: FALKO (10, S. 408) findet keinen nachweisbaren Zusammenhang zwischen Dosis oder Therapiedauer und Nephrotoxizität. Nach HUBMANN (15, S. 156) scheint "Gentamycin bei Einhaltung der Normdosen und Reduzierung der Dosis bei Nierenfunktionsstörungen keine wesentliche Nephrotoxizität aufzuweisen". Dagegen WEINGÄRTNER (40, S. 212): "Nephrotoxische Reaktionen wurden meist nur bei Nierenkranken gefunden." Und HELWIG (13, S. 115) weist darauf hin: "Mit verstärkter Nephrotoxizität ist zu rechnen bei gleichzeitig hochdosierter Gabe von Gentamycin und Cephalosporinen, insbesondere Cephalotin." Auch HUBMANN (15, S. 156) betont in diesem Zusammenhang: "Gefährlich ist die Kombination von Gentamycin mit Cephaloridin bereits bei relativ niedriger Dosierung. Akute Anurien wurden mehrfach beobachtet."

Von allen diesen Nebenwirkungen ist die Ototoxizität am meisten gefürchtet; es gibt jedoch keine einheitlichen Anschauungen darüber, wo eine sichere Grenze bei der Dosierung zu ziehen sei. "Die Häufigkeit toxischer Effekte ist Dosis-abhängig:

es besteht aber keine absolute Korrelation zwischen der insgesamt erhaltenen Gentamicin-Menge bzw. einer überhöhten Serum-Konzentration und dem Auftreten toxischer Reaktionen." (WALTER (39, S. 430))

Um ototoxische Schädigungen zu vermeiden, werden dreierlei Wege empfohlen:

1. Vermeidung hoher Serumkonzentrationen. Etwa 10 µg/ml Gentamycin im Serum werden vielfach als Grenzwert angesehen, oberhalb dessen mit ototoxischen Schädigungen gerechnet werden muß (HITZENBERGER (14, S. 15); WERSALL (41, S. 415); SIMON (35, S. 23); McCracken (4, S. 533 und 5, S. 885); DUME (7, S. 738); RAUCH (29, S. 169).
2. Einhaltung maximaler Einzeldosen. Für Neugeborene empfiehlt ANDERSEN (1, S. 349) 2-4 mg/kg/Tag in 2 oder 3 Dosen. Dagegen hält ELFVING (8, S. 369) in der frühen Kindheit eine Mindestdosis von 3 mg/kg/Tag für nötig, um einen therapeutischen Serumspiegel aufrechtzuerhalten. WALTER (39, S. 432) empfiehlt für Säuglinge und Kleinkinder maximal 0,6 mg/kg alle 8 Stunden, HELWIG (13, S. 115) gibt bei Kindern 0,8-1,2 (-2,0) mg/kg alle 8 Stunden an. Bei Erwachsenen findet RAUCH (29, S. 165) Ototoxikosen nur bei höherer Dosierung als 0,5 g/Tag.
3. Einhaltung maximaler Gesamtdosen. RAUCH (29, S. 165) stellt fest, "daß eine geringe Dosis über eine lange Zeit, d.h. eine größere Gesamtdosis ebenso toxisch wirkt wie eine höhere Einzeldosis über kurze Zeit". HELWIG (13, S. 115) empfiehlt, eine Gesamtdosis von 4,5 g Gentamycin auch bei wiederholter Gabe möglichst nicht zu überschreiten.

Die Einhaltung dieser drei empfohlenen Dosierungsvorschriften gibt jedoch keine absolute Sicherheit. JAO (16, S. 821) beschreibt einen Fall von Ototoxizität nach 14-tägiger Gentamycinbehandlung mit einer Gesamtdosis von nur 1,8 g und maximalen

Serumspiegeln von nur 4,0 $\mu\text{g/ml}$. TJERNSTRÖM (37, S. 77) beobachtet in seiner Untersuchung, daß in allen ototoxischen Fällen der Serumspiegel unter 10 $\mu\text{g/ml}$ lag.

Neuere Untersuchungen scheinen darauf hinzuweisen, daß die Ototoxizität nicht so sehr von den erreichten Serumspitzenpiegeln ("peaks"), sondern eher von der Höhe der vor einer erneuten Applikation noch vorhandenen Serumkonzentration abhängt ("trough level", N.N. 25, S. 1185, von HELWIG (13, S. 114) fälschlich als "through level" zitiert).

Dies wurde zunächst von LINE (22, S. 77) bei Streptomycin beobachtet. Später fand NORDSTRÖM (27, S. 58) auch bei Gentamycin eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Vestibularisschäden und dem Serumspiegel direkt vor einer neuerlichen Injektion, sie nennt den Zeitpunkt "zero time".^{*)}

Außer von diesem "trough level" könnte die Ototoxizität noch von einer mathematischen Funktion abhängen, die durch die unter der Kurve des Konzentrationsverlaufes liegende Fläche oder Teile von ihr dargestellt wird. Diese Funktion könnte Ausdruck des Diffusionsdruckes vom Blut in die Lymphe des Innenohrs sein (N.N. 25, S. 1185).

^{*)} Kritische Anmerkung zur deutschen Nomenklatur: "trough" (sprich: troff) bedeutet wörtlich "Trog", übertragen u.a. "Wellental"; "Trogspiegel" oder "Talspiegel" sind wenig aussagekräftig. Der Begriff "zero time" sollte streng genommen nur für den Zeitpunkt vor der erstmaligen Applikation, nicht vor wiederholter Applikation verwendet werden, damit entfällt "Nullspiegel". "Pre-dose-level" (ROSDAHL (31, S. 119)) scheint die anschaulichste Beschreibung zu sein. Im Deutschen gibt es wohl noch keinen eingebürgerten Begriff dafür; es bieten sich an: "Minimalkonzentration" (zu lang), "Vor-Dosis-Spiegel" (Bindestriche erforderlich, da "Vordosis" den Eindruck erweckt, es handle sich um eine Dosis, die vor einer "Hauptdosis" o.ä. gegeben wird), am prägnantesten scheint mir der Begriff "Basisspiegel" zu sein.

BANCK (2, S. 57) hält die Fläche unter der Konzentrationskurve und die Neigung der Kurve eher für einen Risikofaktor als einige sogenannte toxische Spitzenspiegel. Dazu zeigt er drei angenommene Konzentrationskurven (s. Abb. 5) mit jeweils gleich großen Flächen unter den Kurven. Er hält es für möglich, daß die beiden ersten Kurven, a und b, das größere Risiko darstellen, besonders die sehr flache Kurve b.



Abb. 5: Drei angenommene Serumkonzentrationskurven mit gleich großen Flächen unter der Kurve. Umzeichnung nach BANCK (2).

Zeigt sich an einem hohen Basisspiegel eine verzögerte Ausscheidung, kann durch Verlängern der Dosisintervalle und/oder Verringern der Einzeldosen das Risiko irreversibler Nebenwirkungen herabgesetzt werden.

Diese Überwachung ist besonders bei septischen Früh- und Neugeborenen wichtig, da sie einen schnell wechselnden Allgemeinzustand bei bereits primär eingeschränkter Nierenfunktion aufweisen.

Die routinemäßige Bestimmung des Basisspiegels wird nur dann allgemein Eingang in die Pädiatrie finden, wenn sie vom Klinikpersonal einfach, schnell und ohne großen apparativen Aufwand durchgeführt werden kann. Der Liegeröhrchentest oder eine ähnlich fabrizierte Methode scheint dafür besser geeignet als die bisherige Plattenmethode.

5. Zusammenfassung

Es werden zwei Modifikationen biologischer Schnellmethoden zur Bestimmung von Gentamycin oder anderer Antibiotika in Körperflüssigkeiten beschrieben und mit den herkömmlichen Methoden verglichen. Die Diffusion erfolgt hierbei linear statt radial in vorbereiteten, gut lagerfähigen Agarmedien.

Die Herstellung des Tests erfolgt im bakteriologischen Labor mit Nährböden, Testkeim und Gentamycin-Standard, die industriell vorbereitet und in Art und Menge aufeinander abgestimmt sind. Die Durchführung des vorbereiteten Tests ist so einfach, daß er bei Verwendung vorgefertigter Standard-Blättchen zumindest in Ausnahmefällen, z.B. Nacht- oder Wochenenddienst, von eingearbeitetem klinischem Personal durchgeführt werden kann.

Beide Modifikationen zeichnen sich durch gute Reproduzierbarkeit, geringen Arbeitsaufwand zur Durchführung des Tests in Einfachbestimmung, durch geringen Bedarf an Körperflüssigkeit (1 Tropfen) und für bakteriologische Verhältnisse schnelles Vorliegen der Ergebnisse aus. Sie eignen sich daher besonders zur routinemäßigen Serumspiegelbestimmung vor der erneuten Applikation von Gentamycin oder anderer Aminoglycosid-Antibiotika bei Neu- und Frühgeborenen. Damit soll eine etwaige Kumulation infolge renaler Insuffizienz rechtzeitig erkannt werden. Durch angemessene Verlängerung der Applikationsintervalle lassen sich dann hohe Basisspiegel ("trough levels") bzw. hohe Spitzenspiegel ("peaks") vermeiden, und das Risiko nephro- und ototoxischer Schäden wird herabgesetzt.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) ANDERSEN, J.B., N. ROSDAHL, R. VEJLSGAARD: Aspects of pharmacology of gentamicin in newborn infants.
Acta paediat. scand. 61 (1972) 343-349
- (2) BANCK, G., S. BELFRAGE, I. JUHLIN, L. NORDSTRÖM, Ö. TJERNSTRÖM, N.G. TOREMÄLM: Retrospective study of the ototoxicity of gentamicin.
Acta path. microbiol. scand. section B 81 (1973) suppl. 241, 54-57
- (3) BAUER, A.W., W.M.M. KIRBY, J.C. SHERRIS, M. TURCK: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.
Am. J. Clin. Path. 45 (1966) 493-496
- (4) McCracken, G.H., L.G. JONES: Gentamicin in the Neonatal Period.
Am. J. Dis. Child. 120 (1970) 524-533
- (5) McCracken, G.H.: Clinical Pharmacology of Gentamicin in Infants 2 to 24 Months of Age.
Am. J. Dis. Child. 124 (1972) 884-887
- (6) DEUTSCHBERGER, J., A. KIRSHBAUM: Simplified Equations for Fitting Least Square Lines to Data.
Antibiotics and Chemotherapy 9 (1959) 752-754
- (7) DUME, T.H., E. WETZELS, W. HERMS, E. SCHRÖDER, H. WAHLIG: Zur Pharmakokinetik von Gentamycinsulfat bei Gesunden und Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz.
Dtsch. Med. Wschr. 96 (1971) 734-741
- (8) ELFVING, J., O. PETTAY, O.v. RENKONEN: Gentamycin in the Treatment of Infections in Early Childhood.
Chemotherapy 14 (1969) 366-370
- (9) ERICSSON, H., A.-S. MALMBORG: A micromethod for determination of antibiotic concentrations in body fluids.
Acta path. microb. scand. B 81 (1973) suppl. 241, 107-109
- (10) FALCO, F.G., H.M. SMITH, G.M. ARCIERY: Nephrotoxicity of Aminoglycosides and Gentamicin.
J. Inf. Dis. 119 (1969) 406-409
- (11) HALLMANN, L.: Bakteriologie und Serologie.
G. Thieme, Stuttgart 1950
- (12) HALLMANN, L., F. BURKHARDT: Klinische Mikrobiologie.
G. Thieme, Stgt. 1974
- (13) HELWIG, H.: Antibiotika - Chemotherapeutika.
G. Thieme, Stgt. 1976

- (14) HITZENBERGER, G., I. KATSCHNIG: Abläufe der Serumkonzentrationen und Halbwertszeit von Gentamycin bei unterschiedlicher Dosierung in verschiedenen Altersgruppen von 1-12 Jahren.
Kongreßbericht vom XIII. Int. Kongr. f. Pädiatrie, Wien 1971
- (15) HUBMANN, R.: Urogenitalsystem, in: KUEMMERLE, s.d. 154-158
- (16) JAO, R.L., G.G. JACKSON: Gentamicin Sulfate, New Antibiotic Against Gram-Negative Bacilli.
J. Am. Med. Ass. 189 (1964) 817-822
- (17) JUHLIN, I.: The determination of gentamicin concentrations.
Acta path. microb. scand. B 81 (1973) supp. 241, 48-53
- (18) JUSTESEN, T.: A rapid micro-assay of gentamicin, kanamycin or streptomycin in serum containing penicillins or cephalosporins.
Ebd., 111
- (19) KLEIN, P.: Bakteriologische Grundlagen der chemotherapeutischen Laboratoriumspraxis.
Springer, Berlin etc. 1957
- (20) KUEMMERLE, H.P., N. GOOSENS (Hrsg.): Klinik und Therapie der Nebenwirkungen.
G. Thieme, Stgt. 1973
- (21) KUSCHINSKY, G., H. LÜLLMANN: Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie.
G. Thieme, Stgt. 1972
- (22) LINE, D.H., G.W. POOLE, P.M. WATERWORTH: Serum streptomycin levels and dizziness.
Tubercle 51 (1970) 76-81
- (23) MITCHISON, D.A., C.C. SPICER: A Method of Estimating Streptomycin in Serum and Other Body Fluids by Diffusion through Agar Enclosed in Glass Tubes.
J. gen. Microbiol. 3 (1949) 184-203
- (24) NELSON, J.D., G.H. McCracken, Jr.: Clinical pharmacology of carbenicillin and gentamicin in the neonate and comparative efficacy with ampicillin and gentamicin.
Pediatrics 52 (1973) 801-812
- (25) N.N.: Serum-Gentamicin.
Lancet 1974/II, 1185

- (26) NOONE, P., J.R. PATTISON, D. SAMSON: Simple, rapid method for assay of aminoglycoside antibiotics.
Lancet 1971/II, 16-19
- (27) NORDSTRÖM, L., G. BANCK, S. BELFRAGE, I. JUHLIN, Ö. TJERNSTRÖM, N.G. TOREMÄLM: Prospective study of the ototoxicity of gentamicin.
Acta path. microb. scand. B 81 (1973) suppl. 241, 54-57
- (28) PSCHYREMBEL, W.: Klinisches Wörterbuch, W. de Gruyter, Berlin 1972
- (29) RAUCH, S.: Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, in: KUEMMERLE, s.d. 162-190
- (30) ROHWEDDER, H.-J., U. GOLL: Untersuchungen über die Pharmakokinetik von Gentamycin bei Kindern.
Dtsch. med. Wschr. 95 (1970) 1171-1174
- (31) ROSDAHL, N., J.B. ANDERSEN: Aspects of the pharmacology of gentamicin during the neonatal period.
Acta path. microb. scand. B 81 (1973) suppl. 241, 119-123
- (32) SABATH, L.D., J.I. CASEY, P.A. KUCH, L.L. STAMPEL, M. FINLAND: Rapid microassay of gentamicin, kanamycin, neomycin streptomycin and vancomycin in serum or plasma.
J. lab. clin. Med. 78 (1971) 457-463
- (33) SCHLEGEL, G.: Allgemeine Mikrobiologie.
G. Thieme, Stgt. 1972
- (34) SCHÖNFELD, J.K.: The investigation of bacterial sensitivity in regard to antibiotics. Comparison between dilution and diffusion methods.
Med. Diss. Utrecht 1953
- (35) SIMON, C.: Eine Routinemethode zum Nachweis der Gentamycinblutspiegel während der Therapie.
XIII. Int. Kongr. f. Pädiatrie, Wien 1971
- (36) SMITH, D.H., B. van OTTO, A.L. SMITH: A rapid chemical assay for gentamicin.
New Engl. J. Med. 286 (1972) 583-586
- (37) TJERNSTRÖM, Ö., G. BANCK, S. BELFRAGE, I. JUHLIN, L. NORDSTRÖM, N.G. TOREMÄLM: The Ototoxicity of Gentamicin.
Acta path. microb. scand. B 81 (1973) suppl. 241, 151

- (38) WAHLIG, H., W. HAMEISTER: Eine mikrobiologische Schnell-
methode zur quantitativen Bestimmung von Gentamycin.
XIII. Int. Kongr. f. Pädiatrie, Wien 1971
- (39) WALTER, A.M., L. HEILMEYER: Antibiotika-Fibel.
G. Thieme, Stgt. 1969
- (40) WEINGÄRTNER, L.: Säuglings- und Kindesalter, in: KUEMMER-
LE, s.d. 201-214
- (41) WERSÄLL, J., P.-G. LUNDQUIST, B. BJÖRKROTH: Ototoxicity
of Gentamicin.
J. Inf. Dis. 119 (1969) 410-416
- (42) WIESMANN, E.: Medizinische Mikrobiologie.
G. Thieme, Stgt. 1971

LEBENS LAUF

Name, Vorname: Wildner, Wolfgang
Anschrift: Tannenhäherstraße 24, 1000 Berlin 27
geb.: 14. Oktober 1946 in Berlin
Eltern: Ing. Hans Wildner,
Helga Wildner, geb. Wilke

Schule: Sept. 1953-Juli 1957 Volksschule
Erlangen
Sept. 1957-Juli 1966 Realgymnasium
Nürnberg

Abitur: 19. Juli 1966
Wehrdienst: Okt. 1966-Sept. 1968
Studium: WS 1968/69-SS 1969 Mathematik und
Physik, TU München
WS 1969/70-SS 1975 Zahnmedizin
Uni München

Examen: 11. April 1975
Bestallung als
Zahnarzt: 25. April 1975
Assistenzzeit: Sept. 1975-Jan. 1977
Febr. 1977-März 1978
in zwei Zahnarztpraxen in Berlin

Familienstand: verheiratet mit Helga Wildner,
geb. Schulze - 1 Kind

Berlin, 8. Februar 1978

